

Artikel Asli/Original Article

**Evaluasi Keselamatan *Lactobacillus casei* C1 pada Tikus Wistar
(Safety Evaluation of *Lactobacillus casei* C1 in Wistar Rats)**

SATIRAH ZAINALABIDIN, TAN SIEW MAY & YAP WEI BOON

ABSTRAK

Pada masa kini, probiotik diambil sebagai makanan tambahan secara meluas untuk kebaikan kesihatan. Namun begitu, masih kurang kajian keselamatan terhadap kebanyakan bakteria probiotik. Tambahan pula, khasiat probiotik amat bergantung pada strain yang digunakan dalam penghasilan produk probiotik. Oleh itu, kajian ini amat penting bagi mengkaji keselamatan pengambilan *Lactobacillus casei* (*Lb. casei*) C1 yang baru dipencilkan secara oral. Sebanyak 32 ekor tikus Wistar (WIS) digunakan dalam kajian ketoksikan oral akut (dos tunggal) dan subakut (dos berulang selama 28 hari). Tikus dibahagikan kepada kumpulan kawalan yang diberi salin penimbal (PBS) dan kumpulan kajian yang diberi *Lb. casei* C1 (1011 CFU/ml) secara oral. Dalam ketoksikan oral akut, rawatan diberi sekali setiap 24 jam dan dipantau selama 14 hari. Untuk ketoksikan oral subakut, rawatan diberi setiap hari selama 28 hari dan kesan dipantau sepanjang tempoh masa kajian. Berat badan, makanan dan air direkodkan. Kumpulan akut dan subakut dikorbankan pada hari ke-15 dan ke-29. Serum dikumpul untuk menentukan aras protein jumlah, malondialdehid (MDA), alanina aminotransferase (ALT), aspartat aminotransferase (AST), laktat dihidrogenase (LDH) dan kreatinin. Organ pula diambil untuk pemerhatian histologi. Tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) diperhatikan dalam berat badan, pengambilan makanan dan minuman antara tikus kawalan dan kajian dalam kumpulan ketoksikan oral akut. Bilangan sel darah, aras jumlah protein, MDA, LDH dan kreatinin juga tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan antara tikus kawalan dengan kajian. Hasil yang sama juga direkod untuk kumpulan ketoksikan oral subakut kecuali aras ALT dan AST yang menunjukkan perbezaan signifikan ($p < 0.05$). Tiada perubahan morfologi yang ketara diperhatikan pada organ hepar, ginjal dan ileum tikus kajian berbanding dengan tikus kawalan dalam kedua-dua kumpulan kajian. Kesimpulannya, *Lb. casei* C1 tidak mempunyai kesan toksik pada tikus Wistar maka ia adalah selamat untuk diambil secara oral.

Kata Kunci: Akut; subakut; ketoksikan oral; *Lactobacillus casei*; tikus Wistar

ABSTRACT

Nowadays, probiotics have been widely consumed as supplementary food for their health benefits. However, safety evaluation for many probiotic bacteria is still lacking. Furthermore, health benefits conferred by probiotics depend on the strains used in producing probiotic products. Therefore, it is important to examine oral toxicity of newly isolated *Lactobacillus casei* (*Lb. casei*) C1. A total of 32 Wistar (WIS) rats were divided into acute (single dose) and subacute oral toxicity (28-days repeated dose) groups. Rats in each group were further divided into control group which received phosphate buffer saline (PBS) orally and treatment group that was administered orally with *Lb. casei* C1 (1011 CFU/ml). For acute oral toxicity, treatment was performed on day-1 and the effects were monitored subsequently for 14 days. For subacute oral toxicity, treatment was given daily for 28 days and the effects were observed throughout the experimental period. Body weight, food and water intake of the rats were recorded. Rats in acute and subacute groups were sacrificed on day-15 and day-29, respectively. Serum was collected to determine the levels of total protein, malondialdehyde (MDA), alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) and creatinine. Organs were also harvested for histological examination. There were no significant differences ($p > 0.05$) in body weight, food and water intake between the control and treated rats in acute oral toxicity group. There were also no significant differences in the blood cell count, levels of total protein, MDA, LDH and creatinine between the control and treated rats. Similar findings were recorded for the subacute oral toxicity group, except that the levels of ALT and AST which were significantly different ($p < 0.05$). When observed under a light microscope, there were no morphological changes detected in the kidney, liver and ileum of treated rats as compared to control rats in both of the experimental groups. In conclusion, *Lb. casei* C1 exhibited no toxic effects in Wistar rats hence safe to be consumed orally.

Keywords: Acute, subacute, oral toxicity, *Lactobacillus casei*; Wistar rats

PENGENALAN

Probiotik adalah mikroorganisma hidup yang memberi khasiat kesihatan apabila diambil dalam jumlah yang mencukupi (WHO & FAO 2002). Mikroorganisma probiotik pada umumnya tidak mempunyai ciri-ciri bakteria patogenik, tidak bertoksik, rentan terhadap asid gastrik dan asid hempedu, berkebolehan untuk melekat pada dinding epitelium serta berupaya untuk menghasilkan molekul antimikrob (Singh & Bungler 2014). Bakteria asid laktik adalah antara probiotik yang telah lama dikaji. Kumpulan bakteria tersebut dapat menghasilkan asid laktik melalui proses fermentasi karbohidrat. Bakteria asid laktik terdiri daripada genus dan spesies yang berbeza seperti *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* serta *Saccharomyces boulardii* (Yap & Sujang 2014). Antaranya, *Lactobacillus* sp. telah banyak digunakan dalam penghasilan makanan tapai dan juga merupakan salah satu probiotik bermanfaat dalam menangani masalah ketaktoleransi laktosa dan simptom-simptom alergi. Berdasarkan hasil kajian oleh Tien et al. (2006), *Lb. casei* mampu mengurangkan pengekspresan molekul pro-inflamasi justeru mengurangkan kejadian ketaktoleransi laktosa dan alergi. Kajian oleh Parvez et al. (2006) turut menunjukkan bakteria asid laktik dapat mengubah pH gastrousus, menghasilkan metabolit antimikrob dan bertindak sebagai pesaing untuk patogen dalam sistem gastrousus. Selain dapat mengurangkan reaksi inflamasi dan mengimbangi komposisi mikrobiota dalam sistem gastrousus perumah, bakteria asid laktik seperti *Lactobacillus paracasei* juga mampu menyahaktifkan toksin kulat, justeru menurunkan tahap imunotoksikiti dan tekanan oksidatif toksin tersebut (Abbès et al. 2016).

Walaupun kebanyakan bakteria asid laktik seperti *Lactobacillus* sp. telah diiktiraf sebagai 'Generally Recognized as Safe' (GRAS), namun strain yang baru dipencilkan tidak semestinya memenuhi kriteria GRAS (Jia et al. 2011). Tambahan lagi, dalam kajian oleh Yap et al. (2015) didapati bakteria probiotik yang telah digunakan untuk penghasilan minuman probiotik adalah berlainan daripada yang dilabelkan, maka ini mempengaruhi kualiti minuman probiotik tersebut. Pessione & Cirrincione (2016) juga membincangkan kesan sebatian amina yang dihasilkan oleh segelintir bakteria asid laktik pada kesihatan manusia. Kesan sampingan tersebut termasuk alahan, gejala hipertensi dan sakit kepala. Oleh itu, kajian ini penting untuk menentukan *Lactobacillus casei* (*Lb. casei*) C1 yang dipencilkan oleh Yap et al. (2015) tidak mendatangkan kesan sampingan yang memudaratkan apabila diambil secara oral. Tambahan lagi, ciri-ciri probiotik bakteria sangat bergantung pada strain yang dipencilkan. Oleh sebab yang demikian, evaluasi keselamatan *Lb. casei* C1 telah dijalankan ke atas tikus Wistar jantan bagi mengesan kesan ketoksikan oral akut dan subakut dalam kajian ini. Hasilnya menunjukkan *Lb. casei* C1 tidak mendatangkan

kesan toksik pada tikus Wistar maka ia adalah selamat untuk diambil secara oral.

BAHAN DAN KAEDAH

PENYEDIAAN *Lactobacillus Casei* (*Lb. Casei*) C1

Penyediaan *Lb. casei*. C1 dilakukan seperti yang diterangkan oleh Yap et al. (2015). Sebanyak 10 µL kultur stok *Lb. casei* C1 ditumbuhkan di atas agar deMAN, Rogosa and Sharpe (MRS) selama 48 jam pada suhu 37°C. Koloni tunggal bakteria dipilih dan dikulturkan dalam kaldu MRS dan dieramkan selama 24 jam pada 37°C. Pengemparan kultur dilakukan pada 5,000 xg pada 4°C selama 10 minit. Pelet bakteria dibilas, diemparkan dan dilarutkan dalam PBS pada kepekatan 11 log colony-forming unit (CFU)/ 0.5 ml PBS untuk diberikan secara oral.

MODEL HAIWAN KAJIAN

Sebanyak 32 ekor tikus Wistar jantan (150-200 g) digunakan dalam kajian ini. Tikus ditempatkan dalam bilik makmal pada suhu bilik dengan kitaran cahaya 12 jam dan gelap 12 jam. Makanan dan minuman diberi secara *ad libitum*. Tikus dibiarkan untuk beradaptasi dengan keadaan makmal selama 7 hari sebelum rawatan bermula. Tikus diperolehi daripada Unit Sumber Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia dan pengendalian haiwan dilakukan berdasarkan peraturan dan regulasi oleh Jawatankuasa Etika Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKMAEC) (FSK/2014/SATIRAH/26-NOV./631-DEC.-2014-APR.-2015).

PEMBERIAN *Lb. Casei* C1 KEPADA TIKUS KAJIAN

Dalam ketoksikan oral akut, tikus dibahagikan kepada dua kumpulan. Kumpulan kawalan diberi PBS (0.5 ml/kg) (n = 8) manakala kumpulan kajian (n = 8) diberi *Lb. casei* C1 (10¹¹ CFU/ml) dalam dos tunggal dalam masa 24 jam (Szabo et al. 2011). Selepas itu, pemerhatian fizikal diteruskan selama 14 hari untuk manifestasi simptom ketoksikan. Bagi ketoksikan oral subakut pula, tikus kawalan diberi PBS (0.5 ml/kg) (n = 8) dan kumpulan kajian diberi *Lb. casei* C1 (10¹¹ CFU/ml) (n = 8) secara oral gavaj dalam dos yang sama secara berulang setiap hari, selama 28 hari. Pemeriksaan keadaan fizikal tikus seperti cirit-birit, kekejangan, midriasis, kehilangan koordinasi dan pengeluaran air liur sebelum pemberian dos, 1 hingga 6 jam selepas pemberian dos dilakukan pada setiap hari. Berat badan, pengambilan makanan dan minuman diukur pada setiap hari berdasarkan Persamaan (1)-(3). Tikus dikorbankan dengan menggunakan dietil eter di akhir kajian. Berikut merupakan formula untuk pengiraan bacaan:

$$\text{Peratus perubahan berat badan} = \frac{\text{Berat badan terminal} - \text{Berat badan awal}}{\text{Berat badan awal}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Peratus makanan} = \frac{\text{Jumlah pengambilan makanan sepanjang tempoh rawatan}}{\text{Tempoh rawatan}} \cdot (2)$$

$$\text{Peratus air minuman} = \frac{\text{Jumlah pengambilan air minuman sepanjang tempoh rawatan}}{\text{Tempoh rawatan}} \cdot (3)$$

ANALISIS HEMATOLOGI

Darah diambil melalui sinus orbit pada akhir kajian dan disimpan di dalam tiub EDTA. Pengiraan sel darah merah dan sel darah putih dilakukan dengan hematositometer.

UJIAN BOKIMIA

Aras alanina aminotransferase (ALT) dan aspartat aminotransferase (AST) dalam serum tikus ditentukan dengan kaedah Reitman dan Frankel (1957). Aras protein jumlah pula ditentukan dengan asai Bradford (1976). Aras laktat dehidrogenase (LDH) diukur dengan menentukan kadar penurunan NADH selama 4 min seperti yang diterangkan oleh Decker & Lohmann-Matthes (1988). Kadar pengoksidaan lipid dikaji dengan menentukan kandungan malondialdehid dalam serum tikus seperti yang diterangkan oleh Stocks & Dormandy (1971). Aras kreatinin ditentukan dengan asai kreatinin yang diterangkan oleh Jaffe (1886).

ANALISIS HISTOLOGI

Tisu hepar, ginjal dan ileum yang diawet dengan formalin dipotong secara kecil-kecilan. Tisu tersebut kemudiannya dinyahhidratkan dengan alkohol secara berperingkat. Setelah itu, sampel dibenamkan dalam lilin parafin. Tisu

dihiris dengan ketebalan 3~5 μm lalu ditekapkan pada slaid semalaman. Pemerhatian morfologi dibuat setelah pewarnaan hematoxilin dan eosin dilakukan.

ANALISIS STATISTIK

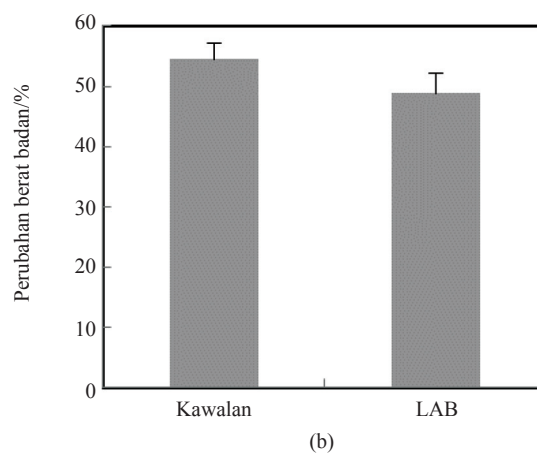
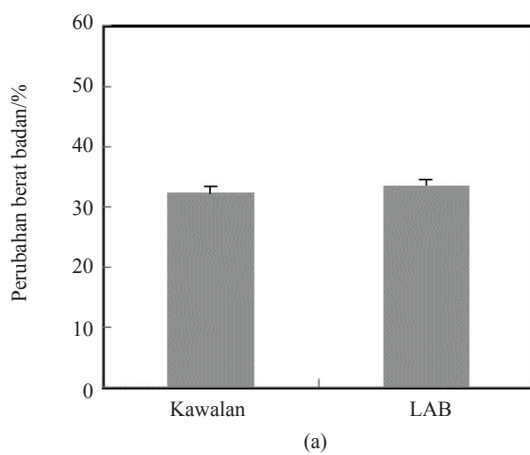
Data dianalisa dengan menggunakan *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versi 22. Ujian Shapiro-Wilk digunakan untuk menentukan taburan data secara normal manakala ujian Levene pula dilakukan untuk memastikan kehomogenan varians. Ujian t tidak bersandar digunakan untuk membandingkan nilai purata antara kumpulan kajian. Data dinyatakan dalam bentuk nilai purata \pm purata ralat piawai (SEM) dengan aras signifikan $p < 0.05$.

KEPUTUSAN

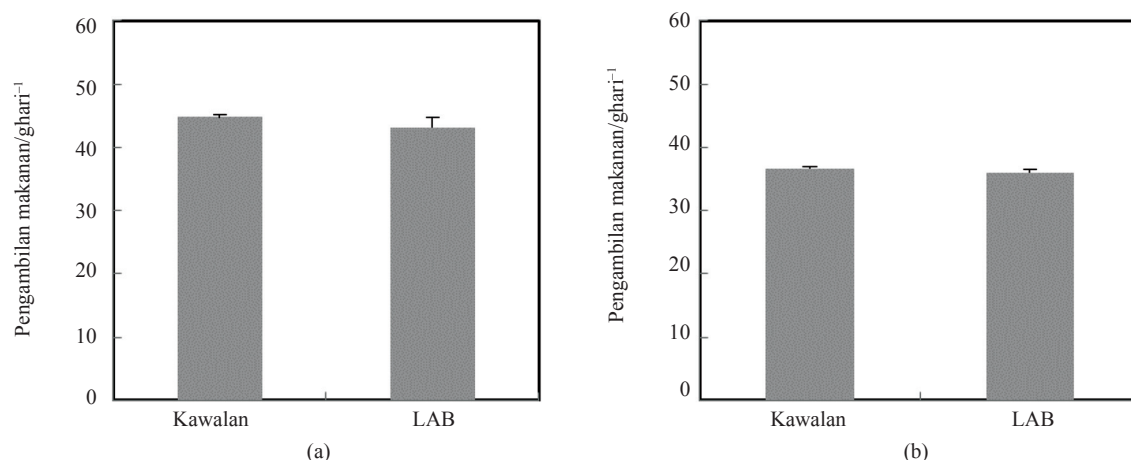
Tiada sebarang kematian direkodkan dalam kedua-dua kajian akut dan subakut. Daripada pemerhatian fizikal, tiada sebarang tanda-tanda ketoksikan seperti tremor, sawan, cirit-birit, keletihan dan koma direkodkan dalam haiwan kajian untuk kedua-dua kajian akut dan subakut.

Rajah 1 menunjukkan perubahan berat badan tikus sepanjang kajian dijalankan. Di akhir kajian, tiada perbezaan signifikan ($p > 0.05$) diperhatikan antara kedua-dua kumpulan ketoksikan akut (kawalan $32.34 \pm 2.38\%$ vs. LAB $33.51 \pm 3.56\%$) (Rajah 1(a)) dan subakut (kawalan $54.55 \pm 2.51\%$ vs. LAB $48.81 \pm 3.26\%$) (Rajah 1(b)).

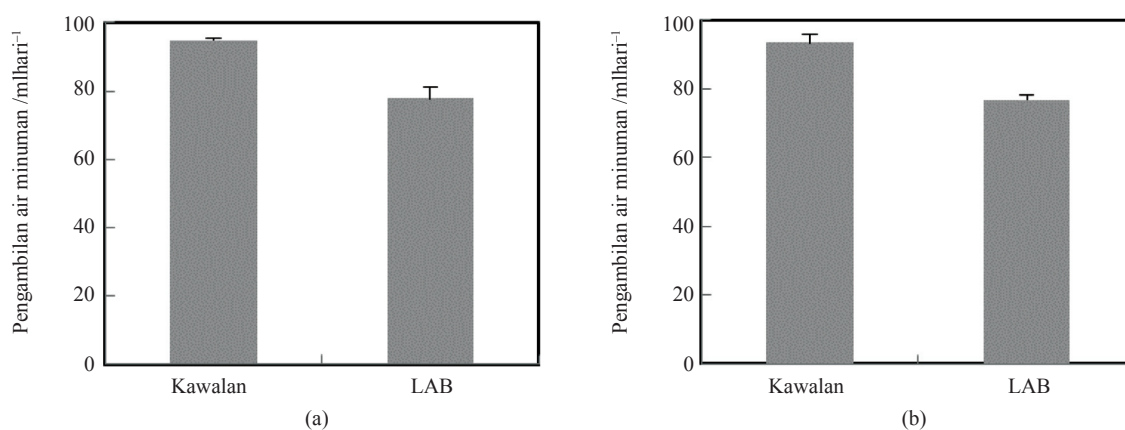
Rajah 2 merumuskan purata pengambilan makanan harian, manakala Rajah 3 menyatakan purata pengambilan air minuman harian bagi ujian ketoksikan akut dan subakut. Tiada perbezaan signifikan ($p > 0.05$) yang dapat diperhatikan. Purata pengambilan makanan tikus adalah sekitar 35~44 g/hari dan air minuman pula adalah sekitar 76~94 ml/hari.



RAJAH 1. Perubahan berat badan tikus dalam kumpulan ketoksikan oral (a) akut dan (b) subakut. Nilai yang dinyatakan adalah dalam bentuk purata \pm SEM



RAJAH 2. Purata pengambilan makanan harian oleh tikus kawalan dan LAB dalam kumpulan ketoksikan oral (a) akut (b) subakut. Nilai dinyatakan dalam bentuk purata \pm SEM



RAJAH 3. Kadar pengambilan air minuman oleh tikus kawalan dan LAB dalam kumpulan ketoksikan oral (A) akut (B) subakut. Nilai dinyatakan dalam bentuk purata \pm SEM

Jadual 1 merumuskan perbezaan bilangan sel darah merah dan sel darah putih bagi kedua-dua fasa kajian. Hasil kajian mendapati tiada perbezaan signifikan dalam kesemua kumpulan kajian di mana sel darah merah adalah dalam sekitar julat $1.2\sim 1.9 \times 10^4 \text{ mm}^3$, manakala sel darah putih pula dalam sekitar julat $1.6\sim 1.9 \times 10^4 \text{ mm}^3$.

Pelbagai analisis biokimia serum telah dijalankan untuk mengesan perubahan pada penanda tekanan oksidatif, fungsi hepar dan juga renal (Jadual 2). Hasil kajian menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan dalam aras protein jumlah, MDA, LDH, ALT, AST dan kreatinin antara tikus kawalan dengan LAB dalam kumpulan ketoksikan oral akut.

JADUAL 1. Bilangan sel darah dalam tikus

	Kumpulan ketoksikan oral akut		Kumpulan ketoksikan oral subakut	
	Kawalan	LAB	Kawalan	LAB
Bilangan sel darah merah/ mm^3	$1.9 \times 10^7 \pm 1.9 \times 10^6$	$1.8 \times 10^7 \pm 1.7 \times 10^6$	$1.2 \times 10^7 \pm 2.4 \times 10^5$	$1.2 \times 10^7 \pm 3.1 \times 10^5$
Bilangan sel darah putih/ mm^3	$1.6 \times 10^4 \pm 9.9 \times 10^2$	$1.6 \times 10^4 \pm 7.1 \times 10^2$	$1.9 \times 10^4 \pm 2.5 \times 10^2$	$1.8 \times 10^4 \pm 4.5 \times 10^2$

Nilai dinyatakan dalam bentuk purata \pm SEM

JADUAL 2. Perbandingan hasil analisis biokimia serum

Analisis biokimia	Kumpulan ketoksikan oral akut		Kumpulan ketoksikan oral subakut	
	Kawalan	LAB	Kawalan	LAB
Protein jumlah (mg/ml)	22.69 ± 0.98	29.56 ± 3.36	31.50 ± 1.35	30.38 ± 3.20
MDA nmol/mg protein)	4.22 ± 0.32	3.83 ± 0.83	1.92 ± 0.20	2.63 ± 0.31
ALT (IU/L)	8.67 ± 1.36	10.69 ± 1.89	8.65 ± 0.54	4.57 ± 0.69 *
AST (IU/L)	5.98 ± 1.95	4.90 ± 0.67	18.55 ± 0.56	12.12 ± 1.49 *
LDH (IU/L)	57.74 ± 12.28	41.07 ± 8.29	239.20 ± 16.36	231.52 ± 23.28
Kreatinin (µg/ml)	2.52 ± 0.44	1.64 ± 0.27	1.61 ± 0.05	1.68 ± 0.04

Nilai dinyatakan dalam bentuk purata ± SEM, *p < 0.05 jika dibandingkan dengan kumpulan kawalan

Dalam kajian ketoksikan oral subakut, kesemua parameter biokimia mempunyai nilai tanpa perbezaan signifikan antara kawalan dan LAB, kecuali bagi penanda fungsi hepar. Aras ALT pada kumpulan LAB didapati menurun dengan signifikan sebanyak 4.57 ± 0.69 IU/L berbanding kumpulan kawalan pada 8.65 ± 0.54 IU/L. Begitu juga dengan aras ALT, kumpulan LAB menunjukkan

penurunan sebanyak 4.90 ± 0.67 IU/L secara signifikan berbanding kumpulan kawalan (5.98 ± 1.95 IU/L).

Pemerhatian histologi pada pelbagai organ tikus kawalan dan LAB bagi kedua-dua fasa ketoksikan oral telah dilakukan di bawah mikroskopik cahaya. Bagi tisu hepar (Foto 1(a-d)), didapati tiada sebarang perubahan patologi yang nyata dan ketara pada kedua-dua kawalan dan LAB

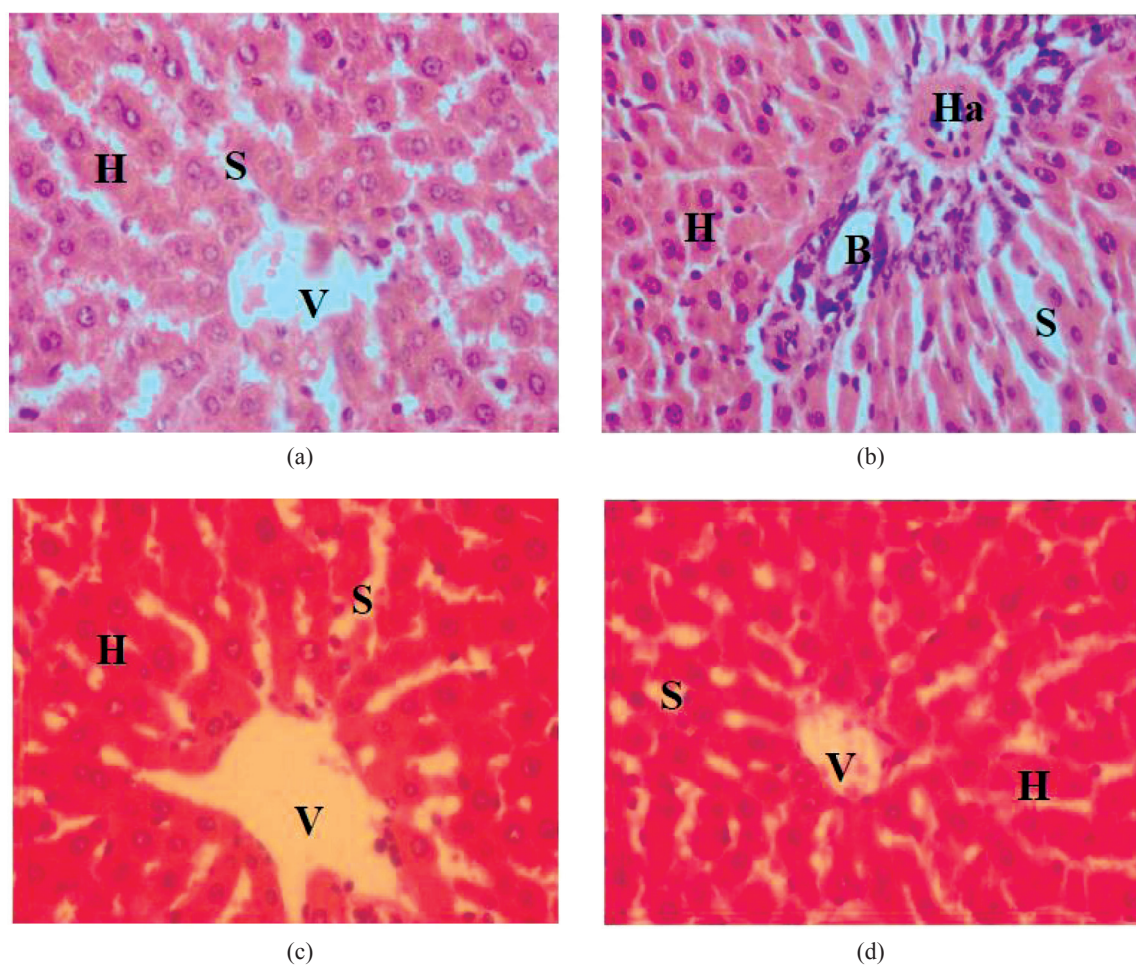


FOTO 1. Histologi hepar tikus (A) kawalan (B) LAB bagi kumpulan ketoksikan oral akut; (C) kawalan (D) LAB bagi kumpulan ketoksikan oral subakut (magnifikasi 400×). B = duktus hempedu, Ha = arteri hepatic, V = vena sentral, H = hepatosit, S = sinusoid

dalam ujian ketoksikan oral akut dan subakut. Lobul hepar dilengkapi dengan vena sentral yang berstruktur normal dan tersusun, serta dipisahkan oleh sinusoid. Tred portal yang mengandung arteri hepar serta duktus hempedu juga jelas kelihatan. Hepatosit mempunyai nukleus yang bulat dan tiada tanda bagi nukleus piknotik mahupun vakuolasi sel. Pemerhatian histologi ginjal (Foto 2(a-d)) juga menunjukkan struktur glomerulus, tubul bergelung

proksimal dan distal tidak terjejas serta jelas kelihatan. Tiada sel-sel nekrotik dan inflamasi yang diperhatikan. Begitu juga dengan histologi usus kecil (Foto 3(a-d)), tiada tanda patologi yang diperhatikan pada kesemua tikus. Tiada perubahan yang ketara diperhatikan dari segi ketinggian vilus dan bilangan sel goblet. Nukleus enterosit yang normal juga jelas kelihatan.

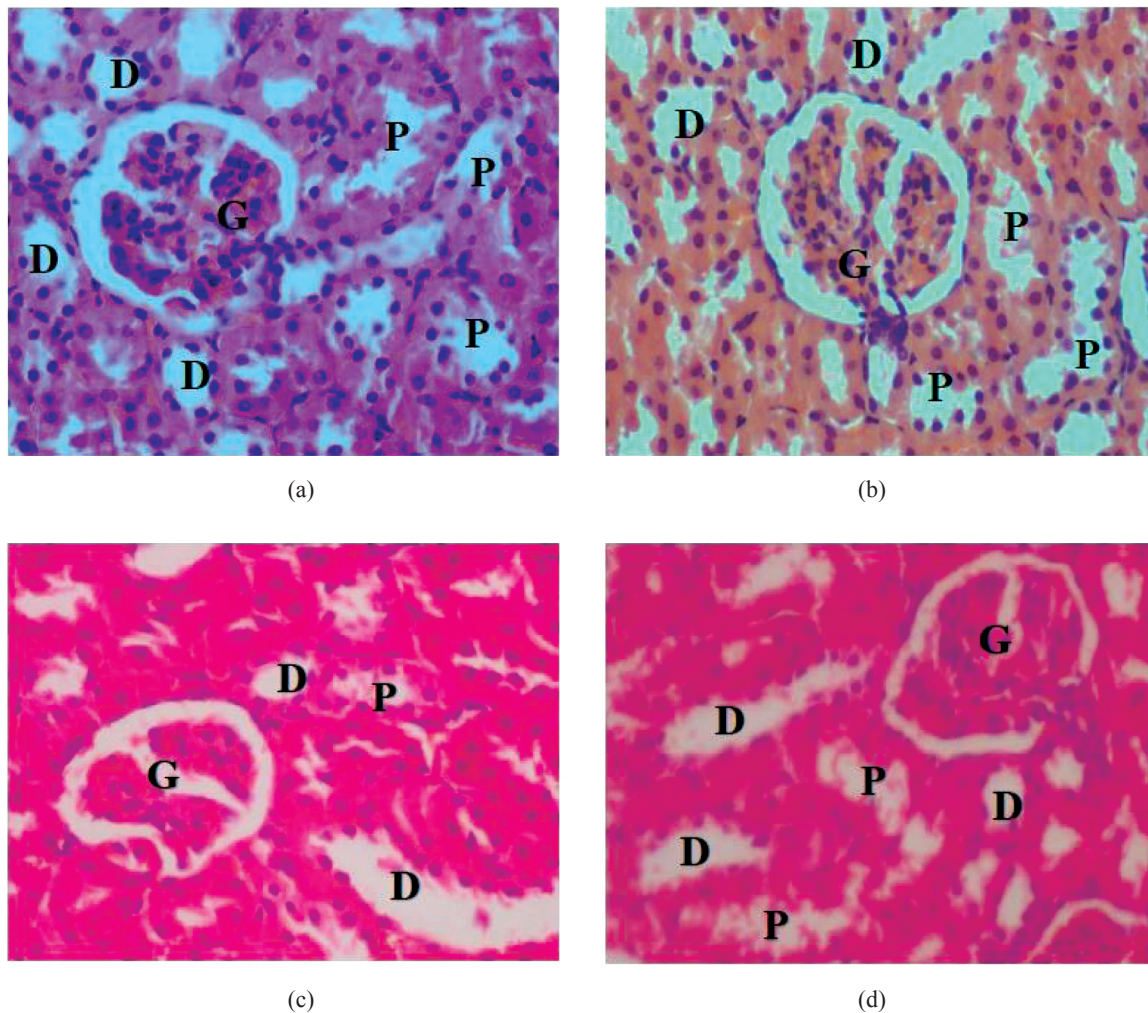


FOTO 2. Histologi ginjal tikus (A) kawalan dan (B) kumpulan LAB bagi kumpulan ketoksikan oral akut; (C) kawalan (D) LAB bagi kumpulan ketoksikan oral subakut (magnifikasi 400×). G = glomerulus, P = tubul bergelung proksimal, D = tubul bergelung distal

PERBINCANGAN

Pengambilan produk probiotik yang terhasil daripada proses fermentasi bakteria asid laktik telah kian lama disarankan atas kebaikan probiotiknya kepada kesihatan manusia (Yap & Sujang 2014). Antaranya, mengimbangi komposisi mikrobiota dalam usus perumah, mencegah pencerobohan patogen berbahaya, menggalakkan pertumbuhan sel usus serta mengelakkan mutasi sel dan

inflamasi setempat. Namun, Yap et al. (2015) mendapati kuantiti dan jenis bakteria probiotik yang digunakan dalam penghasilan minuman probiotik adalah berlainan daripada yang dilabelkan. Sekiranya tidak dianalisa secara tepat, bakteria tersebut berkemungkinan menghasilkan sebatian yang dapat memudaratkan kesihatan pengguna (Pessione & Cirrincione 2016). Oleh itu, kajian ini bertujuan untuk mengkaji keselamatan pencilan *Lactobacillus* baru, iaitu *Lb. casei* C1 dalam tikus Wistar jantan sebelum pencilan

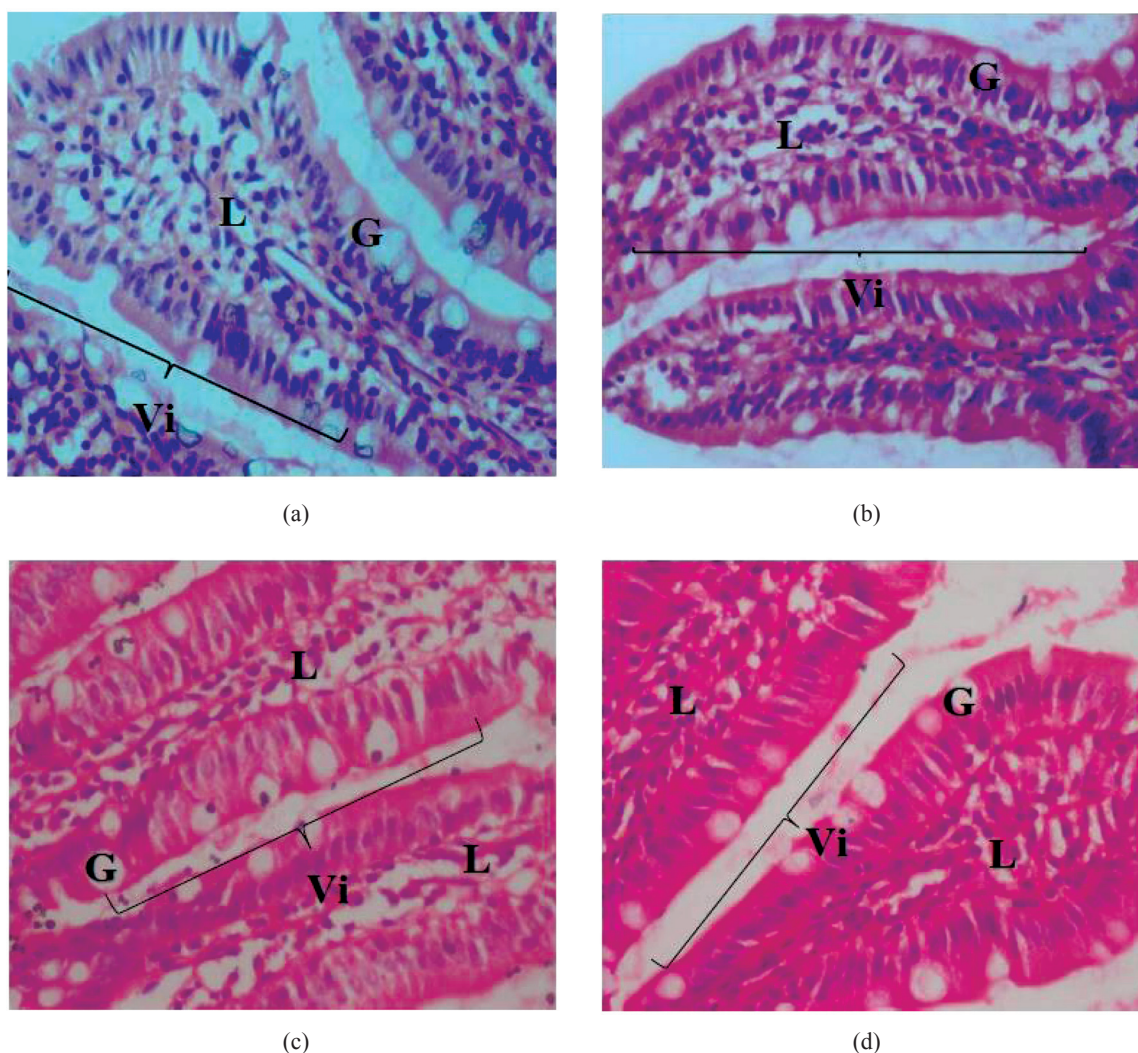


FOTO 3. Histologi ileum bagi (A) tikus (A) kumpulan kawalan dan (B) kumpulan LAB bagi kumpulan dalam kajian ketoksikan oral akut.; (C) kawalan (D) LAB bagi kumpulan kajian ketoksikan oral subakut (magnifikasi 100×). Vi = villi, L = lamina propria, M = mukosa muskularis

tersebut digunakan selanjutnya untuk penghasilan produk probiotik. Apabila sebatian bertoksik diberikan kepada model haiwan seperti tikus, kesan toksiknya boleh menyebabkan tanda-tanda ketoksikan fizikal seperti cirit-birit, kelesuan, bulu menjadi kasar, sawan dan pengeluaran air liur yang keterlaluan dan koma (Hilaly et al. 2004). Lye et al. (2009) turut membuktikan probiotik bakteria dapat memberikan manfaat kesihatan secara optimum kepada perumahannya sekiranya bilangan bakteria mencapai jumlah 10^{11} CFU/ml. Oleh yang demikian, dos LAB yang diberikan kepada tikus Wistar jantan dalam kajian ini ditentukan pada 10^{11} CFU/ml. Dalam kajian ini, tiada tanda-tanda ketoksikan yang diperhatikan pada tikus yang diberi LAB, maka secara amnya dos LAB sebanyak 10^{11} CFU/ml adalah selamat diambil.

Selain itu, pemberian LAB juga tidak mempengaruhi perubahan berat badan serta pengambilan makanan dan minuman tikus pada tempoh akut dan subakut. Pemerhatian ini adalah selari dengan kajian lepas oleh Szabo

et al. (2011) yang menunjukkan pemberian 10^{11} CFU/ml *Lactobacillus pentosus* b240 tidak mempengaruhi selera makan dan minum tikus. Sekiranya bakteria yang diberikan ataupun metabolitnya berupaya untuk merosakkan enterosit dan bersaing tapak reseptor dengan mikroflora dalam gastrousus untuk mendapatkan nutrient, maka tikus tersebut mengalami penurunan berat badan (Madureira et al. 2015).

Hasil ujian hematologi tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan dalam kumpulan ketoksikan oral akut serta subakut. Pemerhatian ini menyokong hasil kajian oleh Songisepp et al. (2012), di mana pemberian *Lactobacillus plantarum* Tensia tidak menyebabkan hemolisis sel darah merah berbanding dengan *Streptococcus pyrogenes* dan *Staphylococcus aureus* yang patogenik. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Owaga et al. (2014) yang menunjukkan pemberian *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 tidak menjejaskan bilangan sel darah merah dan sel darah putih tikus. Justeru, pemberian *Lb. casei* C1 boleh dianggap

selamat kepada sistem haematopoietik yang menghasilkan sel darah dan sel imun.

Ketoksikan *Lb. casei* C1 ke atas fungsi organ penting dapat ditentukan dengan pelbagai analisis biokimia serum. Antara kesan ketoksikan bahan asing pada sistem biologi yang sering dikaji adalah tekanan oksidatif yang terhasil daripada ketidakseimbangan dalam kandungan spesies oksigen radikal (ROS). Paras ROS yang tinggi terbukti mampu menyebabkan kerosakan tisu melalui penghasilan produk pengoksidaan lipid, iaitu malondialdehid (MDA) (Palmieri & Sblendorio 2007). Hasil kajian ini tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan dalam aras MDA serum antara tikus kawalan dengan LAB dalam kedua-dua ujian akut dan subakut. Dapatan kajian ini adalah selari dengan kajian lepas (Lara-Villoslada et al. 2007) yang menunjukkan *Lactobacillus salivarius* CECT5713 tidak menyebabkan perubahan aras MDA dalam mencit.

Kebanyakan protein serum dihasilkan oleh sel hepar, oleh itu, aras protein jumlah boleh menjadi indikasi kepada kesan ketoksikan sesuatu bahan pada fungsi hepar (Gaw 2008). Pengambilan *Lb. casei* C1 tidak menjejaskan fungsi hepar tikus kerana tiada perubahan signifikan dalam aras protein jumlah yang dikesan dalam serum tikus LAB. Dapatan kajian ini menyokong pemerhatian yang dilaporkan oleh Ogawa et al. (2014) yang menggunakan *Lactobacillus kefiranoferiens* M1. Bagi menentukan ketoksikan sesuatu bahan pada fungsi hepar secara khusus, enzim-enzim fungsi hepar yang spesifik seperti ALT dan AST lazimnya diukur (Giboney 2005). Aras AST dan ALT dalam serum akan meningkat sekiranya berlaku inflamasi akibat tekanan oksidatif tinggi lantas menyebabkan hepatosisiti (Geyikoglu et al. 2012). Aktiviti kedua-dua enzim dalam tikus LAB tidak banyak terjejas selepas ujian ketoksikan oral akut dijalankan. Hasil kajian ini menyokong dapatan kajian oleh Lara-Villoslada et al. (2007) yang melaporkan bahawa pemberian *Lactobacillus salivarius* CECT5713 kepada mencit tidak menghasilkan perbezaan signifikan dalam aras enzim ALT dan AST serum. Namun bagi ujian ketoksikan oral subakut, aras ALT dan AST dalam serum tikus kawalan dan LAB berbeza secara signifikan. Keadaan ini mungkin disebabkan oleh variasi biologi antara tikus secara semula jadi, memandangkan aktiviti kedua-dua enzim tersebut masih berada dalam julat normal (5-40 IU/L) (Hayes 2007). Pemerhatian ini juga disokong oleh hasil pemerhatian histologi pada hepar tikus. Dalam tisu hepar tikus LAB, tiada perubahan ketara yang dikesan pada hepatosit dan struktur hepar. Oleh itu, pemberian *Lb. casei* C1 tidak mendatangkan kesan yang mungkin menyebabkan hepatosisiti dalam tikus LAB.

Tahap ketoksikan yang tinggi menyebabkan kecederaan sel dan seterusnya meningkatkan ketelapan membran sel yang membolehkan peresapan enzim LDH ke dalam sistem peredaran darah (Chan et al. 2013). Dalam kajian ini, aktiviti enzim LDH dalam serum tikus kawalan tidak berbeza secara signifikan dengan yang terdapat dalam serum tikus LAB dalam kumpulan ketoksikan oral akut dan subakut. Pemerhatian yang sama juga dilaporkan oleh Szabo et al.

(2011), di mana pemberian *Lactobacillus pentosus* b240 secara oral pada kepekatan 10^{11} CFU/ml kepada tikus tidak menyebabkan perubahan yang ketara dalam aras LDH antara kumpulan kawalan dengan kumpulan rawatan.

Aras kreatinin sering digunakan untuk menentukan tahap fungsi ginjal kerana peningkatan aras kreatinin dalam serum menandakan kegagalan ginjal untuk mengumuh kreatinin yang berlebihan dari badan (Pundir et al. 2013). Dapatan kajian ini menunjukkan aras kreatinin dalam serum tikus tidak terjejas oleh pengambilan LAB dalam kumpulan ketoksikan oral akut dan subakut. Dengan itu, dapatan ini membuktikan bahawa LAB tidak menjejaskan fungsi ginjal.

Pemerhatian histologi juga telah membuktikan bahawa *Lb. casei* C1 tidak mengakibatkan sebarang kerosakan pada struktur hepar, ginjal dan ileum tikus LAB. Morfologi organ-organ tersebut tidak menunjukkan tanda-tanda patologi malahan menyerupai struktur organ dalam tikus kawalan. Degenerasi struktur dan kegagalan fungsi ginjal yang dilaporkan oleh Geyikoglu et al. (2012) akibat serangan ROS aruhan aflatoksin pada tubul dan glomerulus ginjal tidak diperhatikan. Dengan itu, pemberian *Lb. casei* C1 dalam tikus tidak mendatangkan kesan kerosakan pada struktur hepar, ginjal dan ileum tikus.

Secara rumusannya, kajian ini membuktikan pemberian *Lb. casei* C1 (10^{11} CFU/ml) tidak mendatangkan kesan toksik kepada tikus dalam kumpulan ketoksikan oral akut dan subakut. Oleh itu, *Lb. casei* C1 berpotensi dijadikan bakteria probiotik untuk kajian pada masa hadapan.

PENGHARGAAN

Kajian ini ditanggung oleh geran penyelidikan daripada Kementerian Pendidikan Tinggi Malaysia (FRGS/1/2014/SG05/UKM/02/4). Pengarang amat berterima kasih kepada Encik Faisal Malau Ahmad atas bantuan teknikalnya dalam penyediaan manuskrip.

RUJUKAN

- Abbès, S., Salah-Abbès, J.B., Jebali, R., Younes, R.B. & Oueslati, R. 2016. Interaction of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in mice causes immunotoxicity and oxidative stress: Possible protective role using lactic acid bacteria. *Journal of Immunotoxicology* 13(1): 46-54.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1): 248-254.
- Chan, F.K.M., Moriawaki, K. & De Rosa, M.J. 2013. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Dlm. Immune Homeostasis*: 65-70. Springer.
- Decker, T. & Lohmann-Matthes, M.L. 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods* 115(1): 61-69.
- Jaffe, M. 1986. Measurement of creatinine by Jaffe's reaction. *Indian Journal of Experimental Biology* 40(1): 352-354.

- Jia, X., Wang, W., Song, Y. & Li, N. 2011. A 90-day oral toxicity study on a new strain of *Lactobacillus paracasei* in rats. *Food and Chemical Toxicology* 49(5): 1148-1151.
- Gaw, A. 2008. Clinical Biochemistry: An illustrated colour text. Churchill Livingstone.
- Geyikoglu, F., Turkez, H., Bakir, T.O. & Cicek, M. 2012. The genotoxic, hepatotoxic, nephrotoxic, haematotoxic and histopathological effects in rats after aluminium chronic intoxication. *Toxicology and Industrial Health* 29(9): 780-791.
- Giboney, P.T. 2005. Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patients. *American Family Physician* 71(6): 1105-1110.
- Hayes, A.W. 2007. Principles and methods of toxicology. 5th Edition. Taylor & Francis.
- Hilaly, J.E., Israili, Z.H. & Lyoussi, B. 2004. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 91(1): 43-50.
- Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Díaz-Ropero, M., Olivares, M. & Xaus, J. 2007. Safety Assessment of the Human Milk-Isolated Probiotic *Lactobacillus salivarius* Cect5713. *Journal of Dairy Science* 90(8): 3583-3589.
- Lye, H.S., Kuan, C.Y., Ewe, J.A., Fung, W.Y. & Liong, M.T. 2009. The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *International Journal of Molecular Sciences* 10(9): 3755-3775.
- Owaga, E., Chen, M., Chen, W., Chen, C. & Hsieh, R. 2014. Oral Toxicity Evaluation of Kefir-Isolated *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 in Sprague-Dawley Rats. *Food and Chemical Toxicology* 70: 157-162.
- Palmieri, B. & Sblendorio, V. 2007. Oxidative stress tests: Overview on reliability and use. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 11: 308-342.
- Parvez, S., Malik, K., Ah Kang, S. & Kim, H.Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* 100(6): 1171-1185.
- Pessione, E. & Cirrincione, S. 2016. Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: encrypted peptides and biogenic amines. *Frontier Microbiology* 7: 876.
- Reitman, S. & Frankel, S. 1957. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology* 28(1): 56-63.
- Singh, V.A. & Bunger, R. 2014. Probiotics and gut health. *Journal International Medical Sciences Academy* 27(1): 41-43.
- Songisepp, E., Hütt, P., Rätsep, M., Shkut, E., Kõljalg, S., Truusalu, K., Stsepetova, J., Smidt, I., Kolk, H. & Zagura, M. 2012. Safety of a probiotic cheese containing *Lactobacillus plantarum* tensia according to a variety of health indices. *Journal of Dairy Science* 95(10): 5495-5509.
- Stocks, J. & Dormandy, T.L. 1971. The autoxidation of human red cell lipid-induced by hydrogen peroxide. *British Journal of Haematology* 20: 95-111.
- Szabo, N.J., Dolan, L.C., Burdock, G.A., Shibano, T., Sato, S.-I., Suzuki, H., Uesugi, T., Yamahira, S., Toba, M. & Ueno, H. 2011. safety evaluation of *Lactobacillus pentosus* Strain B240. *Food and Chemical Toxicology* 49(1): 251-258.
- Tien, M.-T., Girardin, S.E., Regnault, B., Le Bourhis, L., Dillies, M.-A., Coppée, J.-Y., Bourdet-Sicard, R., Sansonetti, P.J. & Pédrón, T. 2006. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on shigella-infected human intestinal epithelial cells. *The Journal of Immunology* 176(2): 1228-1237.
- WHO & FAO. 2002. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London: World Health Organization, ON, Canada: Food and Agriculture Organization.
- Yap, W.B. & Sujang R.A. 2014. The health benefits of probiotics. *Jurnal Sains Kesihatan Malaysia* 12(2): 41-44.
- Yap, W.B., Sujang, R.A. & Tan, T.S. 2015. Identification and characterization of lactic acid bacteria (LAB) isolated from probiotic drinks in Malaysia. *Jurnal Sains Kesihatan Malaysia* 13(1): 23-31.

Satirah Zainalabidin
 Tan Siew May
 Yap Wei Boon
 Program Sains Bioperubatan
 Pusat Pengajian Sains Diagnosotik dan Kesihatan Gunaan
 Fakulti Sains Kesihatan
 Universiti Kebangsaan Malaysia
 Jalan Raja Muda Abdul Aziz
 50300 Kuala Lumpur, Malaysia.

Pengarang untuk dihubungi: Yap Wei Boon
 E-mel: yapweiboon@ukm.edu.my

Tel: +603-9289 7920
 Faks: +603-2692 9032

Diterima: Jun 2017
 Diterima untuk diterbitkan: Mac 2018

